

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07353

研究課題名(和文) 硫酸化糖鎖の合成制御機構の解明と制御機構を利用した細胞機能の制御

研究課題名(英文) Understanding of the mechanisms of sulfated glycosaminoglycan synthesis and their functions

研究代表者

灘中 里美 (Nadanaka, Satomi)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60378578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：硫酸化糖鎖は発生過程や成熟後の細胞機能の制御や恒常性の維持において多彩な機能を発揮する重要な分子である。発生プログラムの制御下あるいは環境からの刺激を受け、その時・その場に適した糖鎖構造が合成され細胞機能が制御されると考えられているが、状況に応じて糖鎖構造が制御される仕組みの詳細は不明である。本研究では以下の3点を明らかにした。細胞内外の状況(特に糖鎖やコアタンパク質の合成状況)を反映し、場面に応じた糖鎖構造を合成する制御機構の存在を明らかにした。糖鎖合成制御機構の生理的意義について調べた。糖鎖構造の合成制御機構を作動させる低分子化合物の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コアタンパク質にグリコサミノグリカン(GAG)と呼ばれる直鎖状の硫酸化糖鎖が付加したプロテオグリカン(PG)は、細胞表面や細胞外マトリクスに存在し、細胞の増殖・分化をはじめとする種々の機能を制御する。本研究で、コアタンパク質の合成増大に応じてGAG鎖の合成が制御される仕組みを見出したこと、このような制御経路が神経分化過程で働いていることを示したことに学術的意義がある。さらに、この制御経路に関わる転写因子の活性化を引き起こす低分子化合物を見出し、これが神経分化を促進することを明らかにした点に社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Proteoglycans (PGs) are cell-surface and extracellular matrix macromolecules that comprise a core protein to which glycosaminoglycan (GAG) chains are attached. The GAG moiety is essential for the PG functions. Thus, it is considered that cells are equipped with mechanisms that ensure proper GAG synthesis. Recently, Yoshida, H. et al. has reported that the TFE3 pathway allows the Golgi apparatus to regulate protein glycosylation to accommodate cellular demands. In this study, we have examined whether GAG biosynthesis is regulated by the TFE3 pathway. Overexpression of PG core proteins activated TFE3 and induced the expression of GAG biosynthetic enzymes, to sustain proper PG synthesis. In addition, we investigated the biological significance of the TFE3 pathway during neuronal differentiation. Knockdown of TFE3 inhibited neuronal differentiation. Furthermore, we found the small compound which activates TFE3.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：プロテオグリカン グリコサミノグリカン コンドロイチン硫酸

1. 研究開始当初の背景

硫酸化糖鎖が FGF2 などの増殖因子の補受容体として機能し、タンパク質の働きを調節する分子であることは広く認識されている。最近になり、硫酸化糖鎖が受容体に直接認識され、細胞内にシグナルを入力する例が報告されており、申請者らは、硫酸化糖鎖そのものが情報をもつシグナル分子として働く可能性を提案している。これまでに、申請者らは、硫酸化糖鎖の本質的な機能を理解するために、細胞内シグナル経路を調節する硫酸化糖鎖構造を明らかにし (Nadanaka, S. et al., (2008) *J. Biol. Chem.* 283, 27333; Nadanaka, S. et al., (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 4199), その生合成機構について調べてきた (Nadanaka, S. and Kitagawa, H. (2008) *J. Biochem.* 144, 7; Okada, M., Nadanaka, S. et al., (2010) *Biochem. J.* 428, 463; Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Ikegami-Kuzuhara, A., Nadanaka, S., et al. (2008) *J. Biol. Chem.* 283, 27438). これらの研究から、ある時点において存在する糖鎖構造とそれが担う機能について明らかになってきた。しかしながら、硫酸化糖鎖構造は、例えば脳神経系の発生過程で時期特異的に劇的に変化する (Kitagawa, H. et al. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 31377; Miyata, S. et al. (2012) *Nat. Neurosci.* 15, 414). したがって、糖鎖は同じ構造で存続するだけでなく、発生のプログラムに沿って糖鎖構造を変化させ、時期特異的な発生のイベントを制御すると考えられる。以前、申請者らは、形態形成因子 Wnt-3a のシグナルが細胞表面の糖鎖によって糖鎖構造特異的に調節されること、そして興味深いことに、Wnt-3a は標的細胞に形態形成のためのシグナルを入力した後、Wnt/ β -カテニン経路の下流で硫酸化糖鎖の生合成系を操作し、細胞表面の糖鎖構造を変化させ、Wnt-3a 自身の拡散を促し、別の標的細胞へ向かう可能性を明らかにした (Nadanaka, S. et al., (2008) *J. Biol. Chem.* 283, 27333; Nadanaka, S. et al., (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 4199; Nadanaka, S. et al. (2016) *BBRC* 480, 234). このことは、糖鎖構造が細胞外シグナル分子によるシグナル伝達を調節するとともに、入力されたシグナルにより引き起こされた状況の変化や細胞側の要求に応じて、シグナル伝達経路の下流で制御される可能性を示している。これらのことから、糖鎖構造はその時・その場に応じて臨機応変に作り変えられる可能性が想像されている。糖鎖機能は糖鎖構造特異的に発揮されることから、その場に適さない糖鎖の存在は細胞にとって不利益に作用すると考えられる。そのため、糖鎖の合成異常に対処するための制御機構の存在が予想された。ところで、硫酸化糖鎖の合成はゴルジ体で行われる。最近、兵庫県立大の吉田らによってゴルジ体機能の低下に対処するゴルジ体ストレス応答が発見された (Oku, M. et al. (2011) *Cell Struct. Funct.* 36, 1). この応答を担う主要な転写因子の一つに TFE3 があるが、硫酸化糖鎖の合成能が著しく低下し、正常な糖鎖を合成できない変異細胞で TFE3 が活性化し、構成的にゴルジ体ストレス応答が起きていた (Taniguchi, M., Nadanaka, S., et al. (2015) *Cell Struct. Funct.* 40, 13). これらのことから、硫酸化糖鎖の合成異常に応じてゴルジ体ストレス応答が発動し、硫酸化糖鎖の合成が制御される可能性が濃厚になっている。

2. 研究の目的

硫酸化糖鎖は発生過程や成熟後の細胞機能の制御や恒常性の維持において多彩な機能を発揮する重要な分子であり、硫酸化糖鎖の機能はその構造多様性を基盤とする。発生プログラムの制御下あるいはがん化、環境からの刺激を受け、その時・その場に適した糖鎖構造が合成され細胞機能が制御されると考えられているが、状況に応じて糖鎖構造が制御される仕組みの詳細は不明である。また、このような生合成制御機構の破綻は細胞機能の異常を引き起こし、種々の疾患と関連することが予想される。本研究では以下の3点を明らかにする。細胞内外の状況(特に糖鎖やコアタンパク質の合成状況)を反映し、場面に応じた糖鎖構造を合成する制御機構の存在を明らかにする。糖鎖合成制御機構の生理的意義を示す。糖鎖構造の合成制御機構を作動させる低分子化合物の探索を行う。

3. 研究の方法

- ① コアタンパク質を過剰発現した細胞を用いて、糖鎖の合成異常によりゴルジ体ストレス応答が発動することを示し、その下流で制御される糖鎖合成酵素遺伝子を同定する。また、これらの細胞や各種糖鎖合成酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いて糖鎖合成制御機構を発動させる異常な糖鎖構造について検討する。さらに、ゴルジ体ストレス応答が起こらない細胞を作出し、糖鎖合成制御がゴルジ体ストレス応答を介して起きることを示す。また、マクロファージ、がん細胞、及び表皮幹細胞における糖鎖構造の変化や該当糖鎖構造の合成に関わる糖鎖合成酵素遺伝子の発現制御による細胞機能の変化についても調べる。
- ② 神経新生の時期のマウス胎仔にゴルジ体ストレス応答を可視化するレポーターベクターやゴルジ体ストレス応答を誘導する転写因子のノックダウンベクターを導入し、生理的条件下で糖鎖合成制御機構が作動する可能性とその機能的意義を示す。
- ③ 糖鎖合成制御機構を作動させる候補転写因子を活性化する低分子化合物の検索を行う。

4. 研究成果

① プロテオグリカンのコアタンパク質を発現させた HeLa 細胞では、ゴルジ体ストレス応答を示すレポーター GASE 活性 (Oku, M. *et al.* (2011) *Cell Struct. Funct.* 36, 1) が上昇し、小胞体ストレスマーカーである BiP の発現誘導は見られなかった。また、コアタンパク質を発現させた場合、ゴルジ体の容積が有意に増加していることが明らかになった。さらに、ゴルジ体ストレス応答で働く転写因子 TFE3 (Taniguchi, M., Nadanaka, S., *et al.* (2015) *Cell Struct. Funct.* 40, 13) の局在がコアタンパク質の発現によって核に移行することを確認した。プロテオグリカンは、小胞体で合成されたコアタンパク質がゴルジ体に輸送され、グリコサミノグリカン (GAG) と呼ばれる直鎖状の糖鎖の修飾を受け完成する。ゴルジ体へのコアタンパク質の供給量の増加により、糖鎖修飾の不足が起き、その結果、ゴルジ体ストレス応答反応が発動したと考えられた。また、コアタンパク質を発現させた細胞が合成する GAG 量は増加していることがわかった。このことは、プロテオグリカンのコアタンパク質のゴルジ体への influx の増加がゴルジ体ストレス応答を発動させ、GAG の修飾反応を増大させる一因となる可能性を示している。このような仕組みが存在することで、糖鎖修飾不全のプロテオグリカンが細胞表面や細胞外へ出荷されることを防いでいると考えられた。また、炎症状態、がん細胞の増殖能や浸潤能、あるいは乾癬などの皮膚疾患に関連するバリア機能に関連する糖鎖構造と該当糖鎖構造の合成に関わる糖鎖合成酵素遺伝子を明らかにし、これらの生物学的現象が糖鎖の合成異常によりどのような機序で現れるかを調べた。

次に、コアタンパク質により発現が誘導される GAG 生合成酵素遺伝子を調べた。幾つかの遺伝子の変動が観察された。このうち、TFE3 を発現させることによって発現が制御される遺伝子を見出した。この遺伝子の 5' 上流を含む配列をルシフェラーゼの上流に配置させたレポーターベクターを構築し、TFE3 に応答するかどうかを調べたところ、TFE3 を発現させるとレポーター活性が上昇することがわかった。この遺伝子の 5' 上流に GASE 配列 (Oku, M. *et al.* (2011) *Cell Struct. Funct.* 36, 1) が含まれるどうかを探したところ、1ヶ所存在したため、この配列にトランスポージョンで変異を導入した。この変異により TFE3 に対する応答が低下することを確認した。

TFE3 をノックアウトした HeLa 細胞を作成したが、定常状態における GAG の合成量はほとんど変わらず、ゴルジ体ストレスレベルの上昇は見られなかった。TFE3 の発現欠損によって、プロテオグリカンの細胞表面発現量はやや低下していた。定常状態では大きな変化が見られなかったため、②において、分化など細胞内環境を変化させることで TFE3 による GAG 合成酵素遺伝子の発現誘導が生理的にどのような意義をもつかを探ることにした。

② 神経幹細胞様細胞株を分化条件下で培養し、分化にともない発現が複数のプロテオグリカンの発現が上昇することがわかった。①の実験から、コアタンパク質の発現が増加する時にゴルジ

体ストレス応答が起きている可能性が示唆された。この予想に一致して、*TFE3* 遺伝子や *TFE3* の下流で発現が誘導される *GCP60* 遺伝子の発現増加が見られた。また、*TFE3* の発現上昇に呼応して *GAG* 合成酵素遺伝子の発現が増加することを確認した。これらの結果から、神経細胞の分化過程で起こるプロテオグリカンの合成増大に応じてゴルジ体ストレス応答を起こり、その下流で *GAG* 合成酵素遺伝子の発現が制御されていることが示唆された。このような応答反応の機能的意義を明らかにするために、*TFE3* 遺伝子をノックアウトした細胞を作成した。*TFE3* 遺伝子欠損により分化に伴う *GAG* 合成酵素遺伝子の発現上昇が見られなくなった。さらに、神経分化のマーカーである *β III-Tubulin* や *MAP2* 遺伝子の発現を指標に評価した結果、*TFE3* 遺伝子欠損細胞では分化が抑制されていることが明らかとなった。これと同様の表現型が *GAG* 合成酵素遺伝子欠損細胞でも確認された。次に、この現象の生物学的意義を個体レベルで調べるために、*GASE* の下流に *GFP* 遺伝子をつないだレポーターベクターを作成し、これをマウス胎仔脳の脳室面近くで生まれた神経幹細胞に子宮内エレクトロポレーション法を用いて導入した。脳室面に存在する神経幹細胞は分化しながら脳表層へと移動するが、脳室下帯から中間帯に存在する多極性細胞で *GASE* のレポーター活性が観察された。次に、*TFE3* ノックダウンベクターを神経幹細胞に導入し、*TFE3* の発現を抑制すると、神経細胞の脳表層への放射状の移動が抑制され、脳室下帯から中間帯に留まる細胞が増えていた。別の実験系でも *TFE3* による *CS* の合成制御の生物学的意義について探った。中枢神経損傷時にグリア細胞が活性化し、大量のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (*CS-PGs*) が合成され、これが軸索再生を阻害することが知られている。軸索再生阻害に働く *CS* の合成増大に *TFE3* が関与するかどうかについて、マウス脳から単離したアストロサイトや *C8D1A* 細胞株を用いて調べた。損傷時に働くサイトカインの一つ *TGF- β* で刺激すると *TFE3* の局在が核に変化し、*GAG* 合成酵素遺伝子の発現が上昇し、*CS* の合成増加が認められた。*TFE3* のノックダウンしたアストロサイトにおいても、*TGF- β* 刺激によって *CS* が合成されたが、その軸索再生阻害活性は低下していた。これらの結果から、神経分化に働く *CS* の合成や損傷時に軸索再生阻害に働く *CS* の合成に *TFE3* 経路が寄与する可能性が示唆された。

③ *TFE3* による *GAG* 合成酵素遺伝子の発現誘導を促進する低分子化合物の検索を行った。373 化合物のスクリーニングを行った結果、*GAG* 合成酵素遺伝子の発現を *TFE3* 依存的に約 2 倍上昇させる化合物が見つかった。*TFE3* は脱リン酸化により活性化されるが、スクリーニングで得られた化合物の一つは、*TFE3* の脱硫酸化を引き起こすことがわかった。この化合物は *TFE3* を活性化しゴルジ体ストレス応答を促進する活性をもつ可能性が示されたため、②で調べた神経幹細胞様細胞株の神経分化に与える影響を検討したところ、この化合物により神経分化が促進することがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kitazawa, K., Nadanaka, S., Kadomatsu, K., and Kitagawa, H.	4. 巻 4
2. 論文標題 Chondroitin 6-sulfate represses keratinocyte proliferation in mouse skin, which is associated with psoriasis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01618-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nadanaka, S., Hashiguchi, T., and Kitagawa, H.	4. 巻 34
2. 論文標題 Aberrant glycosaminoglycan biosynthesis by tumor suppressor EXTL2 deficiency promotes liver inflammation and tumorigenesis through Toll-like 4 receptor signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 8385-8401
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201902076R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nadanaka, S., Miyata, S., Yaqiang, B., Tamura, J. and Kitagawa, H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Reconsideration of the Semaphorin-3A Binding Motif Found in Chondroitin Sulfate Using Galnac4s-6st-Knockout Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom10111499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nadanaka, S., and Kitagawa, H.	4. 巻 22
2. 論文標題 Insight into the key roles of chondroitin sulfate proteoglycans in cancer biology -Cell signaling regulated by chondroitin sulfates in as structure-specific manner and how it relates to cancer-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycoforum	6. 最初と最後の頁 A8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32285/glycoforum.22A8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 灘中 里美	4. 巻 55
2. 論文標題 コンドロイチン硫酸とカドヘリンの相互作用により何が起こるのか？	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.55.4_305	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nadanaka, S. and Kitagawa, H.	4. 巻 1862
2. 論文標題 Exostosin-like 2 regulates FGF2 signaling by controlling the endocytosis of FGF2.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biocim. Biophys. Acta	6. 最初と最後の頁 791-799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2018.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nadanaka, S., Kinouchi, H., and Kitagawa, H.	4. 巻 293
2. 論文標題 Chondroitin sulfates-mediated N-cadherin/ -catenin signaling associated with basal-like breast cancer cell invasion.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 444-465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.814509	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nadanaka, S., Bai, Y., and Kitagawa, H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Cleavage of Syndecan-1 Promotes the Proliferation of the Basal-like Breast Cancer Cell Line BT-549 via Akt SUMOylation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Cell Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 659428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.659428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 灘中里美ら
2. 発表標題 グリコサミノグリカンの合成異常に着目したAAアミロイドーシス発症制御因子の解明
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 灘中 里美, 宮田 真路, 田村 純一, 北川 裕之
2. 発表標題 神経可塑性に関わるセマフォリン3Aが認識する糖鎖構造の解析
3. 学会等名 第38回日本糖質学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satomi Nadanaka, Hiroki Kinouchi, and Hiroshi Kitagawa
2. 発表標題 Chondroitin sulfate-mediated N-cadherin/ -catenin signaling is associated with basal-like breast cancer cell invasion
3. 学会等名 11th International Conference on Proteoglycans (2019) in Kanazawa (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 灘中 里美、尾上 舞歩、大塚 菜央、坂本 由里子、吉田 有梨花、北川 裕之
2. 発表標題 がん細胞の増殖や浸潤シグナルを制御するグリコサミノグリカン
3. 学会等名 第92回日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬中 里美, 北川 裕之
2. 発表標題 EXT-like 2 によるエンドサイトーシスを介した FGF2 シグナルの制御機構
3. 学会等名 糖質学会年会 (仙台)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀬中 里美, 北川 裕之
2. 発表標題 時間軸に沿って変化する糖鎖の生物学的な意義
3. 学会等名 第91回生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀬中 里美, 木内 啓貴, 戸田 亜梨沙, 山田 純子, 芥川 美沙, 中松 英梨, 鴻池 勢津子, 立花 真奈美, 栄 奈穂, 北川 裕之
2. 発表標題 コンドロイチン硫酸鎖が N-カドヘリン / -カテニン経路の活性化を介して乳がん細胞の浸潤を促進する
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 瀬中 里美, 栗津 朋代, 尾ノ井 孝一, 石野 敦重, 瀬井 めぐみ, 小川 侑佳, 北川 裕之
2. 発表標題 硫酸化糖鎖の合成制御異常が脳の発生に与える影響
3. 学会等名 ConBio2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nadanaka, S., and Kitagawa, H. (Taniguchi, N., Endo, T., Hirobayashi, J., Nishihara, S., Kadomatsu, K., Akiyoshi, K., and Aoki-Kinoshita, K., eds)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 405
3. 書名 Glycoscience: Basic science to applications	

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸薬科大学生化学研究室 https://www.kobepharma-u.ac.jp/edrs/faculty_member_list/biochemistry.html 神戸薬科大学 生化学研究室 https://www.kobepharma-u.ac.jp/edrs/faculty_member_list/biochemistry.html 神戸薬科大学 生化学研究室 ホームページ http://www.kobepharma-u.ac.jp/edrs/faculty_member_list/biochemistry.html
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------